

透明颤菌 *vgb* 基因在枯草芽孢杆菌中的整合表达

张西锋^{1,2}, 李万芬², 郭蔼光¹

(1 西北农林科技大学 生命科学学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 武汉工业学院 生化与制药工程系, 湖北 武汉 430032)

[摘要] **【目的】**将透明颤菌血红蛋白(VHb)基因(*vgb*)在枯草芽孢杆菌中进行整合表达,提高 β -半乳糖苷酶的产量。**【方法】**用枯草芽孢杆菌整合载体 pA01 和启动子 P43 构建 *vgb* 基因的整合表达载体 pA-*vgb*,通过双交叉整合方式,将 *vgb* 基因整合到枯草芽孢杆菌 DB104:bga 的染色体上,构建枯草芽孢杆菌 DB104:vbga。采用 PCR 和 Southern blot 对 DB104:vbga 进行检测,并通过发酵摇瓶试验研究 VHb 对 β -半乳糖苷酶产量的作用。**【结果】**PCR 与 Southern blot 检测结果表明,枯草芽孢杆菌 DB104:vbga 中 *vgb* 基因整合位置正确,且表达的 VHb 蛋白具有生物学活性。摇瓶试验结果表明,在转速 250 r/min 条件下,枯草芽孢杆菌 DB104:vbga 与 DB104:bga 的 β -半乳糖苷酶活性无显著差异;在 150 r/min 的限氧条件下,*vgb* 基因的表达促使 DB104:vbga 的 β -半乳糖苷酶活性较 DB104:bga 提高了 14.9%。**【结论】***vgb* 基因可用于提高枯草芽孢杆菌目的蛋白的产量。

[关键词] 透明颤菌;枯草芽孢杆菌;*vgb* 基因;同源重组

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)09-0199-05

Integrated expression and roles of vitreoscilla hemoglobin gene (*vgb*) in *Bacillus subtilis*

ZHANG Xi-feng^{1,2}, LI Wan-fen², GUO Ai-guang¹

(1 College of Life Science, Northwest A&F University, Key Laboratory for Molecular Biology of Agriculture of Shaanxi, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Department of Biological and Pharmaceutical Engineering,

Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430032, China)

Abstract: **【Objective】**The study obtained Vitreoscilla Hemoglobin gene integration expression in *Bacillus subtilis* for enhancing function in β -Galactosidase production. **【Method】**Using promoter P43 and pA01, an integrated vector of *B. subtilis*, pA-*vgb*, which was an integrated expression vector of *vgb* gene, was constructed. Using the method of double homologous recombination between plasmid pA-*vgb* and *B. subtilis* DB104:bga chromosome, *vgb* gene was integrated into DB104:bga, and then got a *vgb*-integrated expression strain named *B. subtilis* DB104:vbga. The result was identified by PCR analysis and Southern blot. Shake flask was used to study the function of VHb protein in production of β -Galactoside. **【Result】***B. subtilis* DB104:vbga was identified by PCR analysis and Southern blot, and the VHb protein had bio-activity. The results of shake flask showed that: at 250 r/min aeration, the productions of β -Galactoside of *B. subtilis* DB104:vbga and DB104:bga were not significantly different; at 150 r/min aeration, the expression of *vgb* gene can improve β -Galactoside production, and the activity of β -Galactoside was 14.9% higher than that of the control. **【Conclusion】**In this study, it was clearly demonstrated that VHb significantly enhanced β -Galactosidase production by recombinant *B. subtilis*.

* [收稿日期] 2008-12-28

[基金项目] 国家重点新产品计划项目(2003ED760039)

[作者简介] 张西锋(1977—),男,山东鄄城人,在读博士,主要从事微生物学研究。E-mail: zhangxf9465@163.com

[通信作者] 郭蔼光(1942—),女,陕西西安人,教授,博士生导师,主要从事分子生物学研究。E-mail: bioglove@gmail.com

Key words: Vitroscilla; *B. subtilis*; *vgb* gene; integration

透明颤菌为专性好氧革兰氏阴性菌,可生长在贫氧的环境中。Tyree 等^[1]从该菌的蛋白中发现了血红蛋白。该血红蛋白是目前了解最清楚的原核生物血红蛋白(VHb),与真核生物的血红蛋白具有许多相似的性质,是一种氧结合蛋白,在限氧条件下能促进氧的运输和减少耗氧量^[2]。

目前,人们对透明颤菌 VHb 基因(*vgb*)已进行了大量研究,发现该基因的表达能改善宿主细胞的呼吸强度、降低细胞临界氧浓度、促进细胞高密度培养和提高目的代谢产物的产量^[3-9],在微氧环境中这种作用更加明显;并可促进宿主细胞的生长和蛋白的合成,延长细胞的寿命。而在耗氧微生物的工业发酵中,*vgb* 基因能在一定程度上缓解氧的供需矛盾,降低能耗^[7-9]。

枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性菌,具有外分泌性强、细胞壁不含内毒素和发酵性能良好等特点,已广泛用于酶制剂的生产和外源基因的表达。枯草芽孢杆菌 DB104:bga 为西北农林科技大学生命科学学院陕西省农业分子生物学重点实验室构建的产 β -半乳糖苷酶(Bga)基因工程菌。为了提高 DB104:bga β -半乳糖苷酶的产量,本研究构建了 *vgb* 基因的整合表达载体,通过双交叉整合的方式将 *vgb* 基因整合到枯草芽孢杆菌 DB104:bga 的染色体上,得到枯草芽孢杆菌 DB104:vbga,并通过发酵摇瓶试验对 *vgb* 基因的作用进行了研究,以期 *vgb* 基因在枯草芽孢杆菌工业微生物发酵中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酶和试剂 限制性内切酶、DNA 聚合酶、修饰酶、邻硝基苯- β -D-半乳糖苷 (ONPG) 均购自 Promage 公司。

1.1.2 质粒和菌株 大肠杆菌(DH5 α)、带有 *vgb* 基因的质粒 pUC8:16、枯草芽孢杆菌整合载体 pA01 和枯草芽孢杆菌 DB104:bga(β -半乳糖苷酶基因工程菌),均由西北农林科技大学生命科学院陕西省农业分子生物学重点实验室保存和构建。

1.1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 中枯草芽孢杆菌 P43 启动子和 *vgb* 基因的序列,利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 分别设计引物 p1/p2 和 p3/p4:

p1:5'-ATGTCGACCTGTCATGCAGGCCGGG-3',

p2:5'-GGGAATTCCATGTGTACATTCCTC-3',
p3:5'-GGGAATTC ATGTTAGACCAGCAAAC-3',
p4:5'-GCCCCGCGGTTTATTCAACCGCT-3'。

在引物 p1 和 p2 的 5' 端分别引入 *Sal* I 与 *Eco*R I 酶切位点,在引物 p3 和 p4 的 5' 端分别引入 *Eco*R I 与 *Sac* II 酶切位点(下划线碱基即为酶切位点)。引物由三博远志生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养 细菌采用液体 LB 培养基(蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L 和氯化钠 5 g/L)于 37 $^{\circ}$ C 培养。发酵摇瓶试验采用装有 30 mL LBG 培养基(液体 LB 培养基+葡萄糖 10 g/L)的 250 mL 三角瓶,在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。

1.2.2 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备与转化 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备与转化参考文献[9]的方法进行。

1.2.3 VHb 生物学活性和 Bga 活性的测定 (1) VHb 生物学活性的测定^[10]。菌体细胞经超声波处理仪以最大输出功率间断超声处理 1 min,10 000 r/min 离心 2 min 后,将上清液转移到新的离心管内,加入过量的 Na₂S₂O₄ 充分还原 VHb;再向试样中通入 CO 与 VHb 蛋白进行络合反应;最后用紫外分光光度计波长扫描 VHb 与 CO 的络合物,进行 VHb 的 CO 差光谱分析。

(2)Bga 活性的测定。 β -半乳糖苷酶活性的测定参照 Miller 的方法并加以改进^[11]。按照以下公式计算 Miller 活性单位:Miller(密勒)活性单位 = $(66.7 \times OD_{420} / OD_{595}) \times$ 稀释倍数。式中: OD_{420} 为反应混合物吸光度; OD_{595} 为菌液吸光度,反映的是细胞密度。 β -半乳糖苷酶活性单位定义为:在 37 $^{\circ}$ C 条件下,1 mL 菌液与邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)反应,每 min 反应液的 OD_{420} 与菌液的 OD_{595} 的相对值为 1 密勒单位。

1.2.4 枯草芽孢杆菌 DB104:vbga 和 DB104:bga 的培养 接种等量枯草芽孢杆菌 DB104:vbga 和 DB104:bga 的过夜培养物于摇瓶中,在 37 $^{\circ}$ C、转速分别为 250 和 150 r/min 的条件下进行培养。分别在发酵培养 12,18,24,30,36,42,48 和 60 h 取样,测定 Bga 的活性。不同的转速对应不同的供氧量,一般转速与供氧量成正比^[9]。

1.2.5 枯草芽孢杆菌整合表达载体 pA-vgb 的构建与鉴定 以枯草芽孢杆菌 DB104:bga 的基因组

DNA 为模板,用引物 p1 和 p2 扩增启动子 P43。PCR 反应体系为:10×PCR Buffer(Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2.0 μL,引物 p1(20 μmol/L) 2.0 μL,引物 p2 (20 μmol/L)2.0 μL,模板 DNA 2.5 ng, *Taq* 酶(5 U/μL)0.25 μL,加灭菌水至 25 μL。PCR 反应条件为:94 ℃变性 2 min;94 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,35 个循环;72 ℃延伸 10 min。扩增产物经 *Sal* I 和 *Eco*R I 酶切回收后,克隆到枯草芽孢杆菌整合载体 pA01 上,得到枯草芽孢杆菌整合表达载体 pA。

以质粒 pUC8:16 为模板,用引物 p3 和 p4 PCR 扩增 *vgb* 基因。PCR 反应体系为:10×PCR Buffer (Mg²⁺) 2.5 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 2.0 μL,引物 p3 (20 μmol/L)2.0 μL,引物 p4(20 μmol/L)2.0 μL,模板 DNA 2.5 ng, *Taq* 酶(5 U/μL)0.25 μL,加灭菌水至 25 μL。PCR 反应条件为:94 ℃变性 2 min;94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经 *Eco*R I 和 *Sac* II 酶切回收后克隆到枯草芽孢杆菌整合载体 pA 上,得到 *vgb* 基因的枯草芽孢杆菌整合表达载体 pA-*vgb*。pA-*vgb* 质粒的结构见图 1。用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Sac* II 双酶切质粒 pA-*vgb*,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

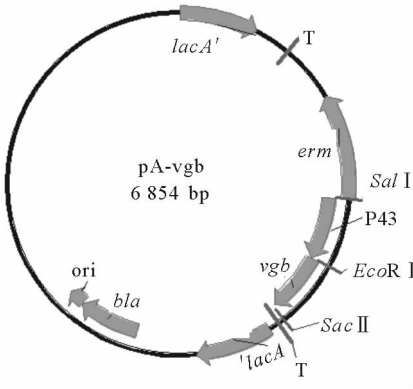


图 1 pA-*vgb* 的质粒结构
Fig. 1 Plasmid of pA-*vgb*

1.2.6 枯草芽孢杆菌 DB104:vbga 的构建与检测
质粒 pA-*vgb* 带有枯草芽孢杆菌 *lacA* 基因的 5' 端和 3' 端,可以作为上、下游同源序列在 *lacA* 位点与枯草芽孢杆菌的染色体进行同源重组。质粒 pA-*vgb* 经限制性内切酶 *Pvu* I 酶切线性化后,采用化学转化法通过双交叉整合的方式,将 *vgb* 基因整合到枯草芽孢杆菌 DB104:bga 的染色体上,得到枯草芽孢杆菌 DB104:vbga, *vgb* 基因的整合过程见图 2。pA-*vgb* 上带有的红霉素抗性基因(*erm*)可作为

抗性筛选标记,将转化后的菌体涂布在红霉素抗性琼脂平板上进行初步的筛选。为了验证枯草芽孢杆菌 DB104:vbga 的正确性,提取其基因组 DNA,采用 PCR 进行检测。以 DB104:vbga 的基因组 DNA 为模板,用引物 p3/p4、p1/p4 进行 PCR 检测,并回收目的片段送三博远志生物科技有限公司测序。经 PCR 验证正确后,以 *vgb* 为探针进行 Southern blot 检测。

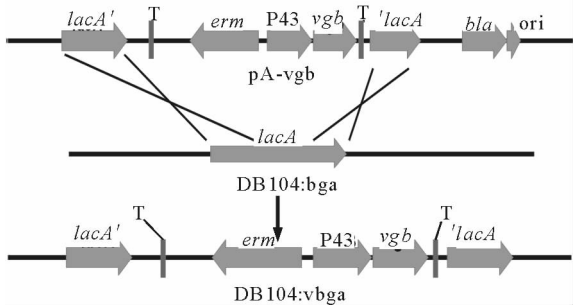


图 2 *vgb* 基因的整合过程
Fig. 2 Integration of *vgb* gene

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌整合载体 pA-*vgb* 的鉴定

pA-*vgb* 经 *Eco*R I 和 *Sac* II 双酶切,得到 6.4 和 0.44 kb 的 2 条带(图 3),与预期结果相符。

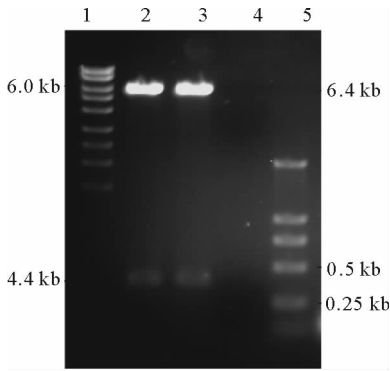


图 3 pA-*vgb* 的酶切鉴定
1. SM0393 Marker;2,3. pA-*vgb* *Eco*R I /*Sac* II 双酶切产物;
4. 空白样品;5. DL2000 Marker;
Fig. 3 Enzyme of plasmid pA-*vgb*
1. SM0393 Marker;2,3. pA-*vgb* *Eco*R I /*Sac* II ;
4. Blank sample;5. DL2000 Marker;

2.2 枯草芽孢杆菌 DB104:vbga 的 PCR 与 Southern blot 检测

枯草芽孢杆菌 DB104:vbga 的 PCR 检测结果见图 4。由图 4 可知,引物 p1/p4 分别扩增出长度为 0.9 kb 的条带。回收目的片段测序,结果表明 *vgb* 基因整合到 DB104:bga 的染色体上。基因组

DNA 的 Southern blot 结果(图 5)显示,样品具有杂交信号,而对照无杂交信号,表明枯草芽孢杆菌 DB104:vgb 构建成功。

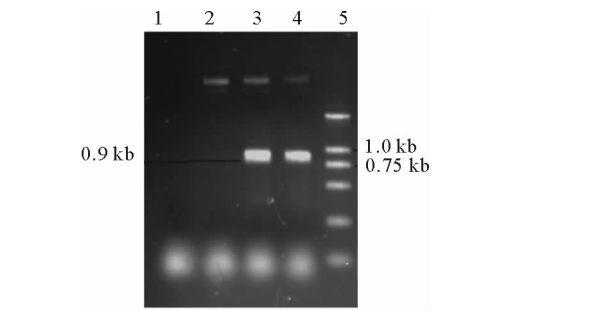


图 4 枯草芽孢杆菌 DB104:vgb 的 PCR 检测

1. 空白对照;2~4. 引物 p1/p4 的扩增产物;

2. 以 DB104:bga 染色体 DNA 为模板;

3~4. 以 DB104:vgb 染色体 DNA 为模板;5. DL2000 Marker

Fig. 4 PCR analysis of *B. subtilis* DB104:vgb

1. The control;2~4. Product of primers p1/p4;

2. Using DB104:bga genome DNA as template;

3~4. Using DB104:vgb genome DNA as template;

5. DL2000 Marker

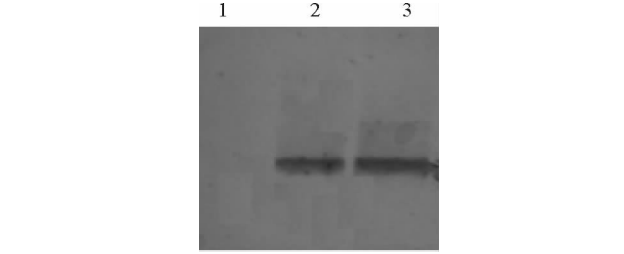
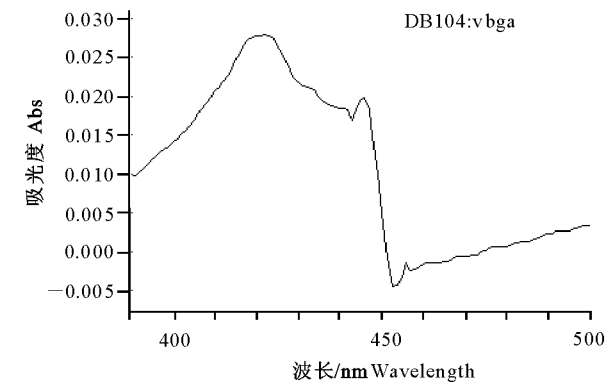


图 5 枯草芽孢杆菌 DB104:vgb 的 Southern blot 检测

1. 对照;2,3. 以 *vgb* 为探针的杂交结果

Fig. 5 Southern blot of *B. subtilis* DB104:vgb

1. The contrapose;2,3. The resultes of Southern blot using *vgb* as probe

2.3 VHb 的 CO 差光谱分析

对 VHb 蛋白进行 CO 差光谱分析,结果(图 6)发现,枯草芽孢杆菌 DB104:vgb 的菌体细胞与 CO 结合后吸光度在 419 nm 处出现峰值;而枯草芽孢杆菌 DB104:bga 的菌体细胞与 CO 结合后没有这种差光谱特性。表明表达的 VHb 能够吸收 CO 形成 CO 结合性血红蛋白,具有生物学活性,同时也表明 *vgb* 基因的整合位置是正确的。

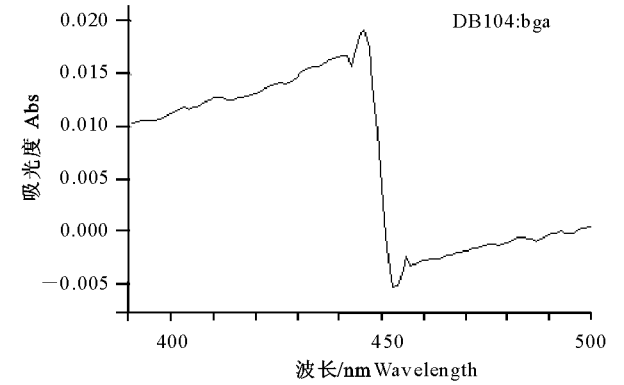


图 6 VHb 的 CO 差光谱分析

Fig. 6 CO-difference spectra of VHb

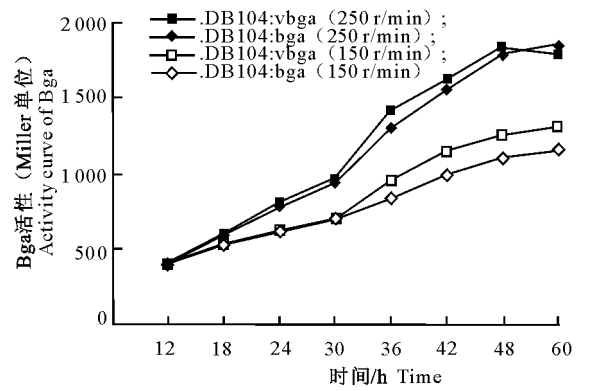


图 7 不同转速下 *B. subtilis* DB104:vgb 和 DB104:bga 的 β -半乳糖苷酶活性曲线

Fig. 7 Activity curve of β -Galactoside (Bga) at different aerations of *B. subtilis* DB104:vgb and DB104:bga

2.4 VHb 对 Bga 活性的影响

由图 7 可知,在转速为 250 r/min 条件下,枯草芽孢杆菌 DB104:vgb 与 DB104:bga 的 Bga 活性无较大差别;在转速为 150 r/min 条件下,枯草芽孢杆菌 DB104:vgb 的 Bga 活性较 DB104:bga 的提高了 14.9%。

3 讨论

目前,人们已在大肠杆菌、假单胞杆菌、链霉菌、气单胞菌及植物中,对 *vgb* 基因作用进行了大量的研究,在限氧条件下其能促进细胞的生长和产物合成^[3-9,12]。在耗氧微生物的工业发酵生产中,氧气的供给是关键因素,*vgb* 基因的引入可缓解氧气的供需矛盾。章银梅等^[13]将 *vgb* 基因转入产碱性蛋白

酶和产木聚糖酶的枯草杆菌工程菌中,结果试验菌种碱性蛋白酶的酶活较对照明显提高,木聚糖酶的活性较对照提高了2倍左右。周艳芬等^[14]将构建的带有 *vgb* 基因的重组质粒转化至苏云金芽孢杆菌中,结果重组菌株 Bt4 的生长量比野生菌株增加了20.2%。在限氧条件下, *vgb* 基因以质粒的形式大量表达,作用较明显,但 *vgb* 基因的表达量并非越大越好^[3,9]。 *vgb* 基因以整合的方式可在宿主中进行稳定的复制和表达,从而避免质粒的不稳定性,及以质粒形式的过量表达对细胞带来的生理负担^[9,15]。Feng等^[9]将 *vgb* 基因整合到产品体蛋白的枯草杆菌菌株 BMB667 的染色体上,在高、中、低3种转速的供氧条件下发酵培养,试验菌株晶体蛋白的产量较对照菌株分别提高了22%,63%和213%,且工程菌遗传稳定。在本试验中, *vgb* 基因以整合的形式克隆到产 β -半乳糖苷酶的枯草杆菌中,在供氧不足条件下, *vgb* 基因的表达使 β -半乳糖苷酶的产量提高了14.9%。

[参考文献]

- [1] Tyree B, Webster D A. The binding of cyanide and carbon monoxide to cytochrome c purified from *Vitreoscilla* [J]. Journal of Biology Chemistry, 1978, 253: 6988-6991.
- [2] Webster D A, Eichhorn G C, Marzilli L G. Structure and function of bacterial hemoglobin and related proteins [J]. In advances in inorganic biochemistry, 1988, 7: 245-265.
- [3] Chen H, Chu J, Zhang S, et al. Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant *Pichia pastoris* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(6): 1205-1212.
- [4] Liu Q, Zhang J, Wei X X, et al. Microbial production of L-glutamate and L-glutamine by recombinant *Corynebacterium glutamicum* harboring *Vitreoscilla* hemoglobin gene *vgb* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 77: 1297-1304.
- [5] Hofmann G, Diano A N. Recombinant bacterial hemoglobin alters metabolism of *Aspergillus niger* [J]. J Metabolic Engineering, 2008, 11(1): 8-12.
- [6] Stark B C, Urgan-Demirtas M, Pagilla K R. Role of hemoglobin in improving biodegradation of aromatic contaminants under hypoxic conditions [J]. J Molecular Microbiology and Biotechnology, 2008, 15(2/3): 181-189.
- [7] Lin Y H, Li Y F, Huang M C, et al. Intracellular expression of

- Vitreoscilla* hemoglobin in *Aspergillus terreus* to alleviate the effect of a short break in aeration during culture [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(13): 1067-1072.
- [8] Wei X X, Chen G Q. Applications of the VHb gene *vgb* for improved microbial fermentation processes [J]. Methods Enzymol, 2008, 436: 273-278.
 - [9] Feng L, Chen S W, Sun M, et al. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Bacillus thuringiensis* improve the cell density and insecticidal crystal proteins yield [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74(2): 390-397.
 - [10] 于慧敏, 史悦, 沈忠耀, 等. CO 差光谱法分析重组大肠杆菌中的透明颤菌血红蛋白 [J]. 清华大学学报: 自然科学版, 2002, 42(5): 615-618.
Yu H M, Shi Y, Shen Z Y, et al. Carbon monoxide difference spectrum analysis of *Vitreoscilla* hemoglobin in recombinant *E. coli* [J]. Journal of Tsinghua University: Natural Science Edition, 2002, 42(5): 615-618. (in Chinese)
 - [11] 张西锋, 李万芬, 袁新宇, 等. 枯草芽孢杆菌生物素操纵子的初步改造 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(7): 169-174.
Zhang X F, Li W F, Yuan X Y, et al. Pro-constructed of *B. subtilis* biotin operon [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(7): 169-174. (in Chinese)
 - [12] Jiang S, Chen D J, Ge M, et al. Cloning and expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Streptomyces hygroscopicus* NND-52-C [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2004, 27(4): 60-63.
 - [13] 章银梅, 李心治, 黄凡, 等. 血红蛋白基因在枯草芽孢杆菌中的表达及其作用的研究 [J]. 遗传学报, 2000, 27(2): 183-188.
Zhang Y M, Li X Z, Huang F, et al. Expression and roles of Hemoglobin gene in *Bacillus subtilis* [J]. Acta Genetica Sinica, 2000, 27(2): 183-188. (in Chinese)
 - [14] 周艳芬, 赵晓喻, 张玉, 等. 透明颤菌血红蛋白基因在苏云金杆菌中的表达 [J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2006, 26(1): 33-37.
Zhou Y F, Zhao X Y, Zhang Y, et al. Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin gene in *Bacillus thuringiensis* [J]. Journal of Hebei University: Natural Science Edition, 2006, 26(1): 33-37. (in Chinese)
 - [15] Kongsoo K, Dale A W, Benjamin C S. Improvement of bioremediation by *Pseudomonas* and *Burkholderia* by mutants of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) integrated into their chromosome [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32: 148-154.